

·基础研究·

头穴丛刺结合跑台训练对坐骨神经损伤大鼠 小腿三头肌萎缩调控及Murf 1蛋白表达影响

王 艳¹ 徐若男² 赵玖玖² 裴 飞¹ 范红石²

摘要

目的:探讨头穴丛刺结合跑台训练对坐骨神经损伤大鼠神经功能恢复、小腿三头肌萎缩,以及肌肉环状指蛋白1(Murf 1)蛋白表达的影响。

方法:清洁级大鼠84只,随机分为5组,其中空白组、假手术组分别6只,模型组、跑台组和头穴丛刺结合跑台组,每组24只,并且每组分为7d、14d、21d、28d四个亚组。采用钳夹法造模,假手术组要充分暴露坐骨神经但不钳夹。造模3天后进行干预,头穴丛刺结合跑台组:头穴丛刺+跑台训练,跑台组:跑台训练,其余3组除定时抓取外不做任何干预。各组相应时间点需要测定坐骨神经功能指数(SFI);小腿三头肌湿重、Western Blotting检测泛素蛋白连接酶Murf 1蛋白的表达。

结果:①小腿三头肌湿重比和坐骨神经功能指数均下降,与模型组比较,头穴丛刺结合跑台组和跑台组均高于模型组($P < 0.05$);且头穴丛刺结合跑台组高于跑台组($P < 0.05$);②Murf 1蛋白的水平明显增加,与模型组比较,跑台组和头穴丛刺结合跑台组均低于模型组($P < 0.05$),且头穴丛刺结合跑台组低于跑台组($P < 0.05$)。

结论:头穴丛刺结合跑台训练以及跑台训练均能够提高SFI,下调Murf 1蛋白水平,减少小腿三头肌湿重比下降,延缓肌肉萎缩,提高坐骨神经功能,并且头穴丛刺结合跑台训练优于单纯跑台训练。

关键词 坐骨神经损伤;小腿三头肌损伤;头穴丛刺;跑台训练;肌肉环状指蛋白1

中图分类号:R745.4, R245 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2019)-01-0022-05

Effects of cluster needling of scalp point combined with treadmill training on the atrophy of triceps surae and the expression of Murf 1 protein in rats with sciatic nerve injury/WANG Yan, XU Ruonan, ZHAO Jiumei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(1): 22—26

Abstract

Objective: To explore the effects of cluster needling of scalp point combined with treadmill training on neural functional recovery, the atrophy of triceps surae and the expression of muscle ring finger protein 1(Murf 1) protein in rats with sciatic nerve injury.

Method: Eighty-four rats of clean grade were randomly divided into 5 groups, including the model group, the treadmill group and the cluster needling of scalp point combined with treadmill group, 24 rats in each group, and each group was divided into 7d, 14d and 21d, 28d subgroups. We also established the blank group and the control group with 6 rats in each group. The clamps method was used to build model and fully exposed sciatic nerve with no clamps was performed the in control group. After 3d The intervention was carried out in 3 days after model was made: the cluster needling of scalp point combined with treadmill group: the cluster needling of scalp point+ treadmill training, the treadmill group: treadmill training, the other three groups :no intervention except timing grab. The sciatic nerve function index (SFI), the wet weight of triceps surae and the expression of Murf 1 protein were detected at each corresponding time points.

Result: ①The wet weight ratio of triceps surae and the sciatic nerve function index decreased and was higher

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.01.006

1 黑龙江中医药大学附属第二医院,哈尔滨,150001; 2 黑龙江中医药大学

作者简介:王艳,女,主任医师; 收稿日期:2017-06-29

in the treadmill group and the cluster needling of scalp point combined with treadmill group when compared with the model group($P < 0.05$). Furthermore the ratio and index were higher in the cluster needling of scalp point combined with treadmill group than that in the treadmill group($P < 0.05$); ② The Murf 1 protein level increased significantly. The protein level was lower in the treadmill group and the cluster needling of scalp point combined with treadmill group compared with model group($P < 0.05$). And the cluster needling of scalp point combined with treadmill group also had the lower Murf 1 protein level than that in the treadmill group($P < 0.05$).

Conclusion: Both the treadmill training and the cluster needling of scalp point combined with treadmill training can improve the SFI, down-regulate Murf 1 protein level, prevent the decrease of wet weight ratio in triceps surae, delay muscle atrophy and enhance the sciatic nerve function. Especially, the cluster needling of scalp point combined with treadmill training has better effect than the treadmill training only.

Author's address The Second Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150001

Key word sciatic nerve injury; leg triceps atrophy; cluster needling of scalp acupuncture; treadmill training; muscle ring finger protein 1

在临床中,周围神经损伤是常见的疾病,主要表现为神经支配区的疼痛,运动和/或感觉功能障碍等,除此之外,周围神经损伤后大脑皮质也会有相应的改变,其相应运动代表区会萎缩变小。随着失神经时间的延长,运动终板发生变化,缺少轴浆提供的营养支配,肌肉的体积缩小,横截面积不断缩小,肌纤维逐渐发生萎缩^[1]。头穴丛刺方法针对性较强能够增加刺激面积,针刺每个穴位都会在针刺部位形成一个场,这个“场”会沿着经络或神经继续传递到达人体相对应的部位,配合行针的手法刺激后,针与组织间发生了物理和化学变化,有学者认为“针场”可以直接穿透颅骨,而作用于大脑皮质,通过脊髓传导通路作用于周围神经发挥作用,促进相应的神经功能修复^[2]。跑台训练作为运动康复的一种训练方式,因为其操作性强,能够量化等因素,所以在实验中广泛应用。坐骨神经损伤后,进行跑台训练,可以促进轴突再生,提高大鼠的步行能力^[3],延缓肌肉萎缩。

在蛋白质降解过程中,一些研究认为泛素蛋白酶系统占据了主要的位置,泛素蛋白连接酶表达水平在肌肉发生萎缩时会升高,而蛋白酶体的抑制剂则可以延缓肌肉萎缩时蛋白分解的速率^[4-5]。而肌肉环状指蛋白 1 (muscle ring finger protein 1, Murf 1) 是骨骼肌蛋白降解的重要信号^[6-8],因此本实验用坐骨神经夹持损伤模型,探讨头穴丛刺结合跑台训练对坐骨神经损伤大鼠神经功能恢复及

Murf 1 蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 84 只,体重(200±20)g,由黑龙江中医药大学药物安全评价中心提供。动物使用许可证:SCXK(黑二 2010007),饲养环境:(21±2)℃,噪音小于 60 分贝,明暗光 12h 交替照,昼夜规律,通风换气良好。适应性喂养后进入实验,实验过程中的动物饲养及取材严格遵守实验动物管理和保护相关规定。84 只大鼠进行称重编号记录后,采用随机数字表法将大鼠随机分为 5 组:空白组、假手术组各 6 只,模型组、跑台组、头穴丛刺结合跑台组每组 24 只,每组按时间点分为 4 个亚组,每个时间点 6 只。4 个时间点分别是造模后 7d、14d、21d、28d。

1.2 实验方法

造模所用器具均经过高压灭菌处理或 75%酒精浸泡消毒,试验台酒精擦拭后铺一次性无菌手术巾,大鼠禁食 12h 后,采用 10%水合氯醛,按 0.35ml/100g 体重经腹腔麻醉,以角膜反射消失为麻醉标准。大鼠呈俯卧位固定于试验台上,用 5 个皮筋将大鼠的四肢和头部固定在相应的钉子处,将大鼠右侧下肢备皮,碘伏消毒,于大鼠右侧股后正中行纵行切口,约 1cm 长(俯卧位固定后,切口处为股部凹陷最低点,切口方向与股部纵轴平行,其下为坐骨神经走行,切口处即坐骨神经体表投影),然后分离深筋膜

及肌肉,游离出坐骨神经,在距坐骨结节6mm处,用止血钳,前端套无菌输液器滴管进行钳夹,钳夹处神经约3mm长,钳夹10s,放松10s,连续3次,然后用手术缝合线逐层缝合肌肉、筋膜、皮肤。假手术组暴露出神经后但不钳夹神经^[9]。

经行为学观察,造模后大鼠行走时身体向健侧倾斜,患侧腿部肌肉收缩无力,前行时靠患侧臀部肌肉的收缩来代偿,足拖地且足背下垂,患侧足趾并拢,伸趾不能,整体行走时呈现出扭臀且跳跃步态,镜下可见轴突、髓鞘、内膜管及内在纤维断裂,但束膜尚完整,符合Sunderland III度损伤,即为造模成功。

1.3 各组干预方法

空白组、假手术组、模型组均正常饲养,除每天定时抓取外不做其他任何干预。跑台组于造模后第3天行跑台训练,头穴丛刺结合跑台组于造模后第3天行头部针刺治疗的同时进行跑台训练,治疗4周。

1.3.1 跑台训练方法:造模前,跑台组和头穴丛刺结合跑台组大鼠都被要求适应性跑台训练,训练3d,即将大鼠放置于跑台上,启动跑台,慢慢调节至大鼠所顺应的速度。造模成功3天后开始正式训练,坡度为0°。速度:训练第1天—第3天8m/min,第4天—第7天12m/min,7天后15m/min。30min/d,每日1次。

1.3.2 头穴丛刺方法:采用安迪牌针灸针(0.25mm×25mm),经75%酒精消毒后,取百会及其两侧旁开2mm处平刺,用速刺法以15°—30°角快速透皮,深度1.5cm。快速捻转1min后留针2h,每日1次。

1.4 检测指标

1.4.1 坐骨神经功能指数(sciatic nerve function index, SFI)检测:自制大鼠足印行走箱,内径8.5cm,长50cm,一侧开门,将等宽、等长70g白纸放在箱底。大鼠双足蘸碳素墨水后由一端放入箱内,走向箱的另一端,并从侧门走出。每侧足留下3或4个足印,选实验侧足(E)、正常侧足(N)足印测量3个变量。

参数:①足印长度(podogram length, PL):足印的最长距离,即从足跟到足尖,每次选用最长的PL值;②足趾宽度(toe spread, TS):第1趾到第5趾连线的距离,每次选用最长的TS值;③中间足趾距离(inter-toes distance, IT):第2趾到第4趾连线的距

离,每次选用最长的IT值。

将上述3个变量代入Bain^[10-11]公式计算出SFI。

$$SFI=109.5(ETS-NTS)/NTS-38.3(EPL-NPL)/NPL+13.3(EIT-NIT)/NIT-8.8$$

以SFI 0为正常值,-100为神经完全断离为指标,计算出SFI的恢复率(%)。

说明:E代表损伤侧,N代表健侧。如ETS即指损伤侧第1趾到第5趾连线的距离。

1.4.2 湿重比测定:各时间点,采用10%水合氯醛,用1ml注射器,按0.35ml/100g体重经腹腔麻醉大鼠,完整取下双侧小腿三头肌,滤纸吸干血液后置于分析天平称重,湿重比=患侧湿重/健侧湿重。取完双侧的小腿三头肌后用过量水合氯醛溶液经腹腔注射行安乐死。

1.4.3 Murf 1测定:湿重比测定完,取患侧小腿三头肌置于冻存管中标记好分组及时间点,液氮中快速冷冻,冻好后取出置于-80℃冰箱中保存。

1.5 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件进行分析,所有数据采用均数±标准差表示。各组间比较用单因素方差分析。若方差齐,两两比较则采用LSD法进行分析;若方差不齐,则采用Dunnett法进行分析。

2 结果

2.1 SFI测定

空白组、假手术组SFI为正常值0,随着时间延长,其他各组SFI值变大,损伤初期(7d时)各组SFI值最小,至时间点28d时,各组SFI最大,各时间点,模型组SFI值最小,跑台组SFI值大于模型组,差异有显著性意义($P<0.05$),头穴丛刺结合跑台组SFI值大于跑台组,差异有显著性意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 大鼠小腿三头肌湿重比

空白组、假手术组湿重比为正常值1,随着损伤时间延长,其他各组湿重比逐渐降低,7d时最高,28d时最低,各时间点,7d时湿重比最大,各时间点,跑台组的湿重比大于模型组,差异有显著性意义。各时间点,头穴丛刺结合跑台组湿重比大于跑台组,差异有显著性意义($P<0.05$)。见表2。

2.3 Western Blotting 检测泛素蛋白连接酶Murf 1的表达

空白组、假手术组 Murf 1 蛋白呈少量表达;模型组、跑台组、头穴丛刺结合跑台组 Murf 1 蛋白表达 7d 时最高,14d 时最低;各时间点,与模型组相比,跑台组、头穴丛刺结合跑台组 Murf 1 蛋白表达上

升,差异有显著性意义($P < 0.05$);各时间点,与跑台组相比,头穴丛刺结合跑台组 Murf 1 蛋白表达降低,差异有显著性意义($P < 0.05$)。见表 3,图 1。

表 1 各时间点各组大鼠坐骨神经功能指数的比较

组别	例数	7d	14d	21d	28d
空白组	6	0	-	-	-
假手术组	6	0	-	-	-
模型组	6	-82.13±5.17 ^{①②}	-62.01±6.12 ^{①②}	-46.15±3.36 ^{①②}	-31.05±3.37 ^{①②}
跑台组	6	-74.36±3.11 ^{①②③}	-48.83±7.86 ^{①②③}	-38.34±4.84 ^{①②③}	-18.83±2.81 ^{①②}
结合组	6	-67.51±4.56 ^{①②③④}	-36.65±5.21 ^{①②③④}	-30.62±2.71 ^{①②③④}	-14.12±1.30 ^{①②③④}

与正常组比较:① $P < 0.05$;与假手术组比较:② $P < 0.05$;与模型组比较:③ $P < 0.05$;与跑台组比较:④ $P < 0.05$

表 2 各时间点各组大鼠湿重比的比较

组别	例数	7d	14d	21d	28d
空白组	6	1	-	-	-
假手术组	6	1	-	-	-
模型组	6	0.661±0.040 ^{①②}	0.597±0.016 ^{①②}	0.526±0.048 ^{①②}	0.445±0.046 ^{①②}
跑台组	6	0.717±0.039 ^{①③④}	0.686±0.018 ^{①③④}	0.597±0.038 ^{①②③}	0.531±0.035 ^{①②③}
结合组	6	0.791±0.043 ^{①②③④}	0.728±0.046 ^{①②③④}	0.667±0.041 ^{①②③④}	0.614±0.038 ^{①②③④}

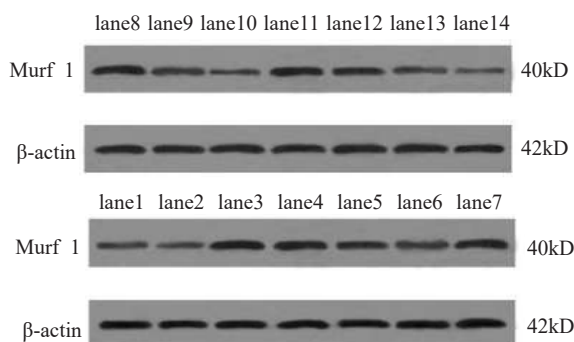
与正常组比较:① $P < 0.05$;与假手术组比较:② $P < 0.05$;与模型组比较:③ $P < 0.05$;与跑台组比较:④ $P < 0.05$

表 3 各时间点各组大鼠 Murf 1 蛋白表达的比较

组别	例数	7d	14d	21d	28d
空白组	6	0.426±0.008	-	-	-
假手术组	6	0.426±0.009	-	-	-
模型组	6	1.380±0.014 ^{①②}	1.176±0.012 ^{①②}	0.958±0.012 ^{①②}	0.666±0.020 ^{①②}
跑台组	6	1.187±0.008 ^{①②③}	1.060±0.012 ^{①②③}	0.858±0.023 ^{①②③}	0.560±0.025 ^{①②③}
结合组	6	1.068±0.013 ^{①②③④}	0.957±0.017 ^{①②③④}	0.751±0.031 ^{①②③④}	0.455±0.027 ^{①②③④}

与正常组比较:① $P < 0.05$;与假手术组比较:② $P < 0.05$;与模型组比较:③ $P < 0.05$;与跑台组比较:④ $P < 0.05$

图 1 各时间点各组大鼠 Murf 1 蛋白表达



lane1:空白组;lane2:假手术组;lane3:模型组 7d;lane4:模型组 14d;lane5:模型组 21d;lane6:模型组 28d;lane7:跑台组 7d;lane8:跑台组 14d;lane9:跑台组 21d;lane10:跑台组 28d;lane11:结合组 7d;lane12:结合组 14d;lane13:结合组 21d;lane14:结合组 28d

3 讨论

中枢神经系统结构和功能的完整性是靠外周信号的输入和效应器官的正常功能活动来维持,神经信号输入不足或完全丧失可导致邻近皮质代表区侵

入去神经输入的皮质代表区,使其功能会进一步丧失,患侧外周信号减少会导致患侧大脑支配相应损伤部位的神经元功能丧失^[12]。周围神经损伤后,头部相应运动代表区会萎缩变小,不利于损伤功能的恢复。因此我们从中枢和周围两方面入手。从中枢角度,针刺头部运动代表区;从刺激周围神经角度,我们进行跑台训练,从而对坐骨神经损伤大鼠进行双向干预,收到了满意的效果,头穴丛刺结合跑台训练能够下调 Murf 1 蛋白水平,减少小腿三头肌湿重比下降,延缓肌肉萎缩,提高坐骨神经功能,疗效优于单纯的跑台训练验证了我们的假说。

于教授讲头部腧穴分为七个区,每个区治疗不同的功能障碍^[13]。在每个区中,按照划线和穴位,头穴丛刺加强治疗面积,增加了刺激量,增强了治疗效果^[14]。百会穴位于巅顶,联系脑部,是调节大脑功能的要穴,再配合配穴,故能通达阴阳脉络,连贯周身经穴^[15]。头穴丛刺可以通过“针场”将神经信号输入

到相应皮质,使其减少局部功能的丧失,从而使相应的周围神经加快恢复的时间以及获得较好的功能^[16]。本实验结果显示,与模型组比较,各时间点跑台组及头穴丛刺结合跑台组 SFI 高于模型组 ($P < 0.05$),各时间点跑台组及头穴丛刺结合跑台组湿重比高于模型组 ($P < 0.05$),各时间点跑台组及头穴丛刺结合跑台组 Murf 1 蛋白表达低于模型组 ($P < 0.05$)。从而证明,头穴丛刺结合跑台训练具有延缓肌肉萎缩的作用^[17]。

研究表明,泛素蛋白酶表达水平在肌肉发生萎缩时会升高,而蛋白酶体的抑制剂则可以延缓肌肉萎缩时蛋白分解的速率^[18],是骨骼肌蛋白降解的重要信号。有学者研究表明,在周围神经损伤中,丁酸可通过增加氧化酶活性、降低蛋白酶活性、调低 Murf1 表达来防治坐骨神经挤压损伤后的肌肉萎缩^[19]。

跑台训练对周围神经损伤恢复和治疗肌肉萎缩具有很好的治疗作用^[20-21]。Armada-Da-Silva^[22]指出周围神经损伤后,康复训练对肌肉的恢复是非常必要的,耐力训练如跑台训练可以调节损伤后的细胞反应,促进周围神经损伤后肌肉神经的再支配,防治失神经肌肉的萎缩。本研究结果显示大鼠的坐骨神经损伤后,失神经支配后湿重比下降,坐骨神经功能指数下降,跑台组高于模型组;Murf 1 蛋白的水平明显增加,模型组高于跑台组,该结果与秦春耀^[23]研究结果一致。

本实验表明,头穴丛刺结合跑台训练可能是通过下调 Murf 1 表达水平、延缓湿重比下降,延缓肌肉萎缩,头穴丛刺结合跑台训练对失神经肌萎缩是有效果的,且优于单纯的跑台训练,证明了中枢结合周围治疗失神经肌萎缩的有效性和优越性。

参考文献

- [1] 王中鹏,孙佳璐,孙忠人,等. 针刺治疗失神经肌萎缩的机制及研究展望[J]. 针灸临床杂志,2012,(09):73—75.
- [2] 吴勃力,于慧敏,杨沈秋. 于致顺教授头穴治瘫经验[J]. 中国针灸,1997,(3):153—154.
- [3] Boeltz T, Ireland M, Mathis K, et al. Effects of treadmill training on functional recovery following peripheral nerve injury in rats[J]. J Neurophysiol, 2013, 109(11):2645—2657.
- [4] 郭艳利,马延. 超运动与泛素蛋白连接酶MAFbx和MuRF1[J]. 内江科技,2014,(2):111—112.
- [5] Rohde JR, Breitkreutz A, Chenal A, et al. Type III secretion effectors of the IpaH family are E3 ubiquitin ligases[J].

- Cell Host Microbe, 2007, 1(1):77—83.
- [6] Larsen CN, Finley D. Protein translocation channels in the proteasome and other proteases[J]. Cell, 1997, 91(4):431—434.
- [7] Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo[J]. Nature Cell Biology, 2001, 3(11):1014—1019.
- [8] 楚燕飞,朱刚,陈菁,等. 联合应用 NGF 和 CNTF 对大鼠坐骨神经损伤后功能恢复的影响[J]. 第三军医大学学报,2002,(4):439—441.
- [9] 万丽丹,刘厚奇,丁文龙. 周围神经损伤后神经组织中 Par-3 蛋白表达和分布的变化[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2010,19(4):335—339.
- [10] Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat[J]. Plast Reconstr Surg, 1989, 83(1):129—138.
- [11] 沈宁江,朱家凯. 坐骨神经功能指数在神经功能评价中的应用[J]. 中华显微外科杂志,1993,16(4):284.
- [12] 王艳,唐强,陈国平. 神经松动手术结合头穴丛刺与康复训练对臂丛神经损伤后上肢功能的影响[J]. 中国康复医学杂志,2011,(6):575—576.
- [13] 孙忠人,朱路文,于致顺. 于氏头穴丛刺针法特色介绍及临床疗效分析[C]. 北京:中国针灸学会年会,2011.567—570.
- [14] 邓元江,梁伟雄. 针灸治疗阿尔海默病的临床研究进展[J]. 针灸临床杂志,2007,23(1):59—60.
- [15] 黄劲柏,潘辉. 艾灸百会结合推拿治疗慢性脑供血不足临床观察[J]. 针灸临床杂志,2011,27(10):31—33.
- [16] 王艳,裴飞,亢连茹,等. 头穴丛刺结合神经松动手术治疗下肢周围神经损伤术后的临床观察[J]. 针灸临床杂志,2015,(5):5—8.
- [17] Mocciano A, Rape M. Emerging regulatory mechanisms in ubiquitin-dependent cell cycle control[J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 2):255—263.
- [18] 刘诗濛,董越娟,刘彬. p62 与蛋白降解途径的研究进展[J]. 生理学报,2015,(1):48—58.
- [19] Walsh ME, Bhattacharya A, Liu Y, et al. Butyrate prevents muscle atrophy after sciatic nerve crush[J]. Muscle Nerve, 2015, 52(5):859—868.
- [20] Bito H, Takemoto- Kimura S. Ca^{2+} /CREB/CBP- dependent gene regulation: a shared mechanism critical in long-term synaptic plasticity and neuronal survival[J]. Cell Calcium, 2003, 34(4—5):425—430.
- [21] Voss MW, Erickson KI, Prakash RS, et al. Neurobiological markers of exercise-related brain plasticity in older adults[J]. Brain Behav Immun, 2013, 28(3):90—99.
- [22] Armada-da-Silva PA, Pereira C, Amado S, et al. Role of physical exercise for improving posttraumatic nerve regeneration[J]. Int Rev Neurobiol, 2013, 109(3):978—1016.
- [23] 秦春耀. RNA 干扰 MuRF1 基因延缓大鼠失神经骨骼肌萎缩[D]. 太原:山西医科大学,2015.